

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/16792 (43) Date de publication internationale: 22 juin 1995 (22.06.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/IB94/00414 (22) Date de dépôt international: 13 décembre 1994 (13.12.94) (30) Données relatives à la priorité: 3761/93-3 16 décembre 1993 (16.12.93) CH (71)(72) Déposants et inventeurs: STROUN, Maurice [FR/CH]; 6, rue Pedro-Meylan, CH-1208 Genève (CH). ANKER, Philippe [CH/CH]; 335, rue de Bernex, CH-1233 Bernex (CH). VASIOUKHIN, Valeri [RU/US]; 320 North Austin Boulevard #5, Oak Park, IL 60302 (US). (74) Mandataire: MICHELI & CIE; 122, rue de Genève, Case postale 61, CH-1226 Thônex (CH).		(81) Etats désignés: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSING CANCER (54) Titre: METHODE POUR LE DIAGNOSTIC DE CANCERS (57) Abstract <p>A method for diagnosing and/or monitoring the development of cancer by analysing the deoxyribonucleic acid (DNA) in blood plasma, and particularly by detecting any gene alterations in cancer cell DNA, e.g. oncogene mutations or deletions, tumour suppressor gene mutations or deletions, or microsatellite alterations.</p> (57) Abrégé <p>La méthode selon l'invention pour le diagnostic et/ou le suivi de l'évolution de cancers comprend l'analyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) présent dans le plasma sanguin. Cette analyse concerne plus particulièrement toute modification génique propre à l'ADN de cellules cancéreuses, par exemple la détection de mutations ou délétions d'oncogènes, ou bien de mutations ou délétions de gènes suppresseurs de tumeurs ou encore les modifications de microsatellites.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

- 1 -

METHODE POUR LE DIAGNOSTIC DE CANCERS

La présente invention concerne une méthode de diagnostic et/ou de suivi de l'évolution de divers types de cancers après un traitement de chimiothérapie ou après une opération.

On sait que le diagnostic et le suivi de l'évolution des cancers sont effectués, à part l'observation et l'examen direct de tumeurs, par analyse de biopsies ou, dans le cas de cancers du sang, de la moelle osseuse, ce qui implique soit une intervention chirurgicale soit un test invasif du type biopsie ou aspiration médullaire avec aiguille. Or, en plus du caractère désagréable voire dangereux pour les patients de telles méthodes, il a été constaté qu'elles pouvaient en outre être peu précises. Dans le cas de certaines maladies leucémiques par exemple, l'analyse de l'échantillon de moelle prélevée n'a pas permis de retrouver toutes les variétés clonales malignes.

Le but de cette invention consiste donc à fournir une méthode de diagnostic de cancers qui soit d'une part plus précise et plus fiable et d'autre part qui soit plus facile à réaliser et n'impliquant pas de test invasif sur les patients.

La méthode de diagnostic et/ou suivi de l'évolution de cancers, objet de l'invention et visant à atteindre le but précité, comprend l'analyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) présent dans le plasma sanguin.

- 2 -

Il a en effet maintenant pu être démontré que des patients atteints de différentes maladies cancéreuses présentaient des taux augmentés d'ADN dans le plasma sanguin. La méthode de diagnostic selon l'invention est donc basée sur la détection de mutations géniques dans cet ADN plasmatique, le plasma sanguin étant un matériau humain beaucoup plus facilement accessible que des biopsies de tumeurs par exemple. Ainsi, des mutations d'oncogènes sont fréquemment mises en évidence dans de nombreux types de tumeurs malignes, et parmi elles les mutations du gène ras sont particulièrement significatives. Toutefois, la méthode peut s'appliquer à n'importe quelle modification génique propre à l'ADN de cellules cancéreuses, telles les mutations ou délétions de gènes ras, APC, DCC, P53, etc. ou de n'importe quel oncogène ou antioncogène (gène de suppression de tumeurs) ou encore les modifications de microsatellites. On a même observé que différentes mutations des gènes ras détectées dans l'ADN du plasma sanguin pouvaient être absentes dans l'ADN des cellules sanguines périphériques ou dans le cas de certains patients leucémiques de la moelle osseuse, ce qui tend à confirmer la plus grande fiabilité de la méthode selon l'invention en comparaison avec les méthodes de diagnostic connues.

D'une manière générale, la méthode de diagnostic selon l'invention consiste à extraire l'ADN du plasma sanguin, à purifier et amplifier cet ADN, puis à déterminer les mutations ou délétions géniques dans celui-ci, ceci en principe de manière comparative entre le plasma sanguin d'une personne présumée malade et celui de personnes en bonne santé.

- 3 -

La portée de la présente invention s'étend à toute technique d'extraction, purification et amplification d'ADN du plasma sanguin; de même, n'importe quelle méthode de détermination des mutations géniques peut être utilisée.

La méthode de diagnostic selon l'invention sera maintenant illustrée plus en détails en référence aux deux exemples qui suivent :

Exemple 1 : Diagnostic du cancer du colon par détection de mutations du gène K-ras.

Dans cette première application de la méthode selon l'invention, on a utilisé la détermination de mutations dans le codon 12 des gènes K-ras contenus dans des adénocarcinomes du colon. Ces mutations apparaissent généralement lors de la transition du stade adénome I en adénome II, avant la délétion ou la mutation du gène P53, c'est-à-dire relativement tôt dans l'évolution de la tumeur.

Des échantillons de sang (20-30 ml) de 15 patients présentant différents stades d'adénocarcinome colorectal ont été prélevés sur héparine, ces patients n'ayant reçu durant cette période aucun médicament anti-cancéreux. Treize des 15 patients ont ensuite subi une ablation chirurgicale de la tumeur; de même, on a également prélevé environ 400 ml de sang au total sur des personnes saines afin d'en isoler l'ADN du plasma.

L'ADN a été extrait des tumeurs et des cellules sanguines selon des techniques usuelles bien connues.

Quant à l'extraction de l'ADN du plasma sanguin, elle peut être effectuée de la manière suivante : le plasma est

- 4 -

d'abord soumis à des traitements par du phénol, de l'éther et du chloroforme. Après dialyse contre la SSC (chlorure de sodium 0,15 M, citrate de trisodium 0,015M), on fait passer le produit à travers une colonne Concanavalline A-Sépharose afin d'éliminer les polysaccharides, puis on le centrifuge dans un gradient de Cs_2SO_4 .

L'ADN ainsi extrait et purifié (10 à 100ng) a ensuite été soumis à une amplification par PCR du premier exon du gène K-ras dans un volume de 100 μl .

Les amplimers étaient le
5'-GACTGAATATAAACTTGTGGTAGT-3' et le
5'-CTATTGTTGGATCATATTCGTCC-3'.

Les amplifications ont été effectuées dans un tampon contenant 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-MCl à pH 0,3, 200mM de chaque nucléotide, 1,8 mM de MgCl_2 , 0,2 μM de chaque précurseur et 2,5 unités de "AmpliTag" ADN polymérase. 35 cycles ont été réalisés pour l'ADN des tumeurs et des cellules sanguines et 45 cycles pour l'ADN du plasma (94°C pendant 1 min. , 59°C pendant 1,5 min., 72°C pendant 1 min., le dernier cycle étant prolongé de 7 min. à 72°C).

En ce qui concerne la détection des mutations , elle peut être effectuée par n'importe quelle méthode connue et appropriée. Dans le présent exemple, elle a été réalisée de deux manières différentes pour chaque échantillon testé.

(a) Hybridisation de produits PCR avec sondes oligonucléotiques spécifiques aux mutations (selon Verlaan de Vries et al., Gene 50, 313-320, 1986):

Les produits PCR ont été disposés en quantités égales sur des membranes "Zeta-probe" (Bio-Rad, Hercules, CA) et

- 5 -

hybridisées avec les oligonucléotides spécifiques pour des K-ras mutants ou sauvages. Les oligonucléotides étaient marqués avec ^{32}P ddATP (Amersham, GB). Afin de séparer les hybrides parfaits des "mismatches", le lavage final des membranes a été effectué dans une solution contenant du chlorure de tétraméthylammonium 3M, 50 mM de Tris-HCl à pH 8,0 et 0,2 mM EDTA et 0,1 % SDS à 58°C pendant 1 heure.

(b) Amplification PCR avec amplimers spécifiques de mutations ponctuelles ou amplification PCR pour allèles spécifiques (PASA) (selon Sommer et al, Biotechnique 12, 82-87, 1992):

Dans cette méthode plus sensible, l'ADN est soumis à une amplification PCR avec des amplimers complémentaires aux séquences normales GLY ou mutées ALA, VAL, SER, ASP ou CYS. Les amplimers spécifiques aux mutations ont des terminaisons 3' complémentaires aux mutations au point spécifiques. L'enzyme Taq I polymérase (Perkin-Elmer Cetus, CH), n'a pas d'activité exonucléasique en 3' et est donc incapable d'amplifier l'ADN si le mismatch d'une seule base est situé à la terminaison 3' de l'amplimer.

Chaque PCR a été effectué dans un volume de 40µl d'une solution contenant 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl à pH 8,3, 2 mM de chaque nucléotide, 0,7 mM MgCl_2 , 0,2 mM de chaque précurseur et 1 unité de "AmpliTaq" ADN polymérase. Trente-cinq cycles ont été effectués (94°C pendant 1 min., recuit à 55-62°C pendant 2 min., extension à 72°C pendant 1 min,). Le dernier cycle a été étendu de 7 min. à 72°C. Chaque réaction a été amorcée avec la technique "hot-start". Les amplimers utilisés étaient les suivants :

- 6 -

5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG-3' pour le K-ras sauvage (renaturation à 55°C), 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGC-3' pour le mutant ALA 12 (renaturation à 62°C), 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGT-3' pour le mutant VAL 12 (renaturation à 61°C), 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTA-3' pour le mutant SER 12 (renaturation à 59°C), 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGA-3' pour le mutant ASP 12 (renaturation à 60°C), 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTT-3' pour le mutant CYS 12 (renaturation à 59°C) et dans chaque cas l'amplifier "antisense" 5'-CTATTGTTGGATCATATTCGTCC-3'.

Après amplification, les produits de la réaction ont été analysés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 0,8 %.

En utilisant la première technique (a) décrite ci-dessus, il s'est avéré qu'il n'était pas possible de mettre en évidence les mêmes mutations dans l'ADN du plasma que celles détectées dans l'ADN des tumeurs prélevées (GLY en VAL, GYS en ALA); cette technique ne semble pouvoir être appliquée ici que si environ 10 % au moins de l'ADN total présente une mutation ponctuelle. Par contre, les mutations précitées ont pu être identifiées dans l'ADN du plasma avec la seconde technique (b) décrite précédemment; il apparaît que cette technique permet d'identifier les mutations dans un échantillon d'ADN du plasma mélangé avec un excès de 10^4 à 10^5 d'ADN normal non muté. D'autre part, avec la même technique, il n'a pas été possible de détecter les mêmes mutations sur les échantillons d'ADN de cellules sanguine.

Enfin, tous les échantillons de contrôle provenant de personnes en bonne santé se sont révélés négatifs, c'est-

- 7 -

à-dire ne présentant pas de mutations de l'ADN du plasma.

Exemple 2 : Diagnostic de cancers dus à des désordres myéloïdes par détection de mutations du gène N-ras.

On sait qu'une prédominance de mutations N-ras ont été observées dans l'ADN de la moelle osseuse de patients présentant un syndrome myélodysplasique (MDS) ou une leucémie myéloblastique aigüe (AML).

On a prélevé 20 à 30 ml de sang sur dix patients atteints de AML ou MDS, ce sang étant recueilli sur héparine et centrifugé sur gradient "Ficoll Hipaque" (Pharmacia, SE). On a également prélevé 400 ml de sang sur des personnes saines. L'interphase contenant des cellules mononucléaires a été recueilli et utilisé pour l'extraction de l'ADN des cellules sanguines. La phase supérieure a été centrifugée à 2500 G pendant 15 minutes, et le surnagent a été utilisé pour l'extraction de l'ADN du plasma. De plus, quelques échantillons de moelle osseuse des mêmes patients ont été prélevés pour analyse de contrôle.

L'ADN des cellules sanguines et de la moelle a été isolé par traitement à la Protéinase K (Merck, DE) en présence de SDS, puis extraction au phénol, précipitation à l'éthanol et gradient de Cs_2SO_4 . L'ADN du plasma a été extrait comme décrit dans l'exemple 1.

L'ADN (10-100 ng) a été amplifié dans un volume de 100µl. Les amplimers utilisés (Oncogene Science, NY, USA) étaient 5'-GACTGAGTACAACTGGTGG-3' et 5'-CTCTATGGTGGGATCATATT-3' pour le premier exon du gène N-ras. Les amplifications ont été effectuées dans un

- 8 -

"Thermo-Cycler 480" automatique (Perkin-Elmer Cetus, CH) dans les mêmes conditions que celles de l'Exemple 1. Chaque cycle consistait en une étape de dénaturation à 94°C pendant 1 minute, une renaturation (à 51°C pour N-ras) pendant 1,5 minutes et une extension d'une minute à 72°C avec un troisième segment d'extension de 5 secondes par cycle. Le dernier cycle a été suivi par une extension de 7 minutes à 72°C. Les produits de l'amplification (109 np) ont été analysés par électrophorèse dans du gel polyacrylamide 0,8%.

Les deux mêmes méthodes de détection des mutations que dans l'Exemple 1 ont été employées. Dans la seconde technique (b), on a utilisé comme amplimers pour N-ras 5'-CTGGTGGTGGTTGGAGCAGA-3' pour le mutant ASP 12, 5'-GGTGGTGGTGGAGCAGGT-3' pour le mutant CYS 13, et 5'-CTCTATGGTGGGATCATATT-3' comme amplimer "antisense".

Les résultats des analyses obtenus permettent de confirmer que l'ADN des patients malades présentait une ou plusieurs mutations du codon 12 (GLY en CYS ou en ASP) ou du codon 13 (GLY en CYS) du gène N-ras, alors que toutes ces mutations n'ont pas pu être identifiées dans l'ADN des cellules sanguines, ni même dans celui de la moelle osseuse.

Ainsi, il ressort des deux exemples illustratifs ci-dessus que l'analyse de l'ADN du plasma sanguin peut constituer une méthode de diagnostic et du suivi de l'évolution d'une maladie cancéreuse qui est plus pratique, moins traumatisante (simple prélèvement de sang chez le patient) et parfois même plus fiable que les méthodes connues impliquant le prélèvement d'une biopsie.

REVENDICATIONS

1. Méthode pour le diagnostic et/ou le suivi de l'évolution de cancers comprenant l'analyse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) présent dans le plasma sanguin.
2. Méthode selon la revendication 1 comprenant l'extraction de l'ADN présent dans le plasma sanguin, la purification et l'amplification de l'ADN, et la détection de mutations géniques dans cet ADN.
3. Méthode selon la revendication 2, dans laquelle on détecte les mutations ou délétions d'oncogènes, ou bien les mutations ou délétions de gènes suppresseurs de tumeurs ou encore les modifications géniques propres à l'ADN de cellules cancéreuses.
4. Méthode selon la revendication 3, dans laquelle la détection est appliquée à tout oncogène ou antioncogène ou gène de suppression de tumeurs, par exemple aux gènes APC, ras, DCC ou P53, ou encore aux modifications de microsatellites.
5. Méthode selon l'une des revendications 2 à 4, dans laquelle l'ADN est amplifié par réaction de la polymérase en chaîne (ci-après "PCR").
6. Méthode selon l'une des revendications 2 à 5, dans laquelle la détection des mutations géniques est effectuée par hybridation des produits par PCR avec des sondes oligonucléotiques spécifiques aux mutations.

- 10 -

7. Méthode selon l'une des revendications 2 à 5, dans laquelle la détection des mutations géniques est effectuée par amplification par PRC avec des amplimers spécifiques aux mutations ponctuelles.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 22456 (TRUSTEES OF DARMOUTH COLLEGE) 11 November 1993 see the whole document ---	1-7
A	US,A,4 871 838 (J.L.BOS ET AL.) 3 October 1989 see column 14, paragraph 2 - column 15, paragraph 1; claims 1-7 -----	6,7

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 1995

Date of mailing of the international search report

04.04.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No

PCT/IB 94/00414

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9322456	11-11-93	CA-A- 2134552	11-11-93
US-A-4871838	03-10-89	NONE	

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,93 22456 (TRUSTEES OF DARMOUTH COLLEGE) 11 Novembre 1993 voir le document en entier ---	1-7
A	US,A,4 871 838 (J.L.BOS ET AL.) 3 Octobre 1989 voir colonne 14, alinéa 2 - colonne 15, alinéa 1; revendications 1-7 -----	6,7

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 Mars 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

04.04.95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gurdjian, D

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/IB 94/00414

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9322456	11-11-93	CA-A- 2134552	11-11-93
US-A-4871838	03-10-89	AUCUN	